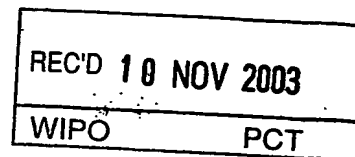


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen:

102 43 529.4

Anmeldetag:

19. September 2002

Anmelder/Inhaber:

Charité – Universitätsmedizin Berlin (Charité),
Berlin/DE

Erstanmelder: Universitätsklinikum Benjamin
Franklin der Freien Universität Berlin, Berlin/DE

Bezeichnung:

Verfahren zum Auffinden geeigneter
Chromatographiebedingungen zur
Trennung biologischer Moleküle

IPC:

B 01 D 15/08

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 10. Oktober 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Faust



Universitätsklinikum Benjamin Franklin
Der Freien Universität Berlin
Hindenburgdamm 30
12200 Berlin

XI 1163/02

Verfahren zum Auffinden geeigneter Chromatographiebedingungen zur Trennung biologischer Moleküle

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein multiparalleles Verfahren zum schnellen Auffinden geeigneter Chromatographieparameter zur Trennung biologischer Moleküle.

Die Erfindung betrifft insbesondere ein multiparalleles Chromatographie-System zur Methodenentwicklung zur Reinigung von Proteinen und anderen Biomolekülen. Das System nutzt Kavitäten von Multiwell-Platten (z.B. 96-Well-Platten), die mit Chromatographiegele befüllt sind und besteht aus diversen Startpuffern, in dem die zu chromatographierenden Proben gelöst werden und mit denen die Gele equilibriert sind und Lösungen zum Desorbieren (Eluieren) der an die Gele gebundenen Biomoleküle.

Für die Entwicklung von chromatographischen Fraktionierungsschritten zur Reinigung von Biomolekülen werden gegenwärtig im wesentlichen drei verschiedene Chromatographie-Systeme von den Firmen Amersham Bioscience (Äkta-Systeme: <http://www1.amershambiosciences.com>), Applied-Biosystems (BioCAD® 700E Workstation, www.appliedbiosystems.com) und BioRad (BioLogic DuoFlow, www.bio-rad.com) verwendet. Mit diesen Systemen können nacheinander eine Reihe von Parametern variiert werden, um geeignete Bedingungen für die Reinigung

von Biomolekülen zu finden. Diese Suche nach den geeigneten Parametern zur Reinigung und Fraktionierung von beispielsweise Biomolekülen wie Proteinen, Peptiden, Nukleinsäuren etc. ist zeitintensiv und in der Regel ineffektiv. So lehren Erfahrungswerte aus der biotechnologischen / medizinischen / chemischen Praxis, dass bei der Suche nach geeigneten Chromatographiebedingungen eine Vielzahl von chromatographischen Medien sowie eine Vielzahl von chromatographischen Elutionsparametern in möglichst kurzer Zeit auf ihre Brauchbarkeit getestet werden müssen, um aus den gewonnenen Daten effektive Reinigungs- bzw. Fraktionierungsschritte abzuleiten. Hierbei stellte sich heraus, dass diese Ziele sich mit den oben genannten Systemen (Versuche mit dem Äkta-System) nur mit einem hohen zeitlichen und finanziellen Aufwand erreichen lassen.

Ausgehend von diesem Stand der Technik ist es daher Aufgabe der Erfindung eine effektivere und leicht zu handhabendere Methode zur geeigneten Auswahl von Chromatographieparametern zum Aufbau von Reinigungs- bzw. Fraktionierungsschritten von biologischen Proben zu schaffen. Ferner ist es Ziel der Erfindung ein geeignetes Computer-Programm zur Erfassung und Interpretation der Ergebnisse der Chromatographie zu Verfügung zu stellen.

Gelöst wird diese Aufgabe durch die im Patentanspruch 1 aufgeführten Merkmale.

Im Sinne der Erfindung werden unter „biologischer Probe“ gereinigte oder ungereinigte Proteine, Peptide, Nukleinsäuren aller Art, Kohlenhydrate, Lipide, niedermolekulare Metaboliten oder Gemische derselben verstanden. Dies beinhaltet insbesondere – aber nicht ausschließlich – komplexe Proteingemische von humanem, tierischen oder pflanzlichen Geweben oder Zellen sowie Zellen von Mikroorganismen. Die „biologische Probe“ wird im folgenden auch mit „Biomolekülen“ bezeichnet.

Im Sinne der Erfindung werden unter Chromatographiemedien zweierlei Arten verstanden:

- a) Materialien, Verbindungen oder Substanzen, die die biologische Probe zu binden vermögen. Dies sind beispielsweise (aber nicht ausschließlich) alle Arten von Ionenaustauscher (Anionenaustauscher, Kationenaustauscher), Metallaffinitätschromatographiemedien, Reversed-Phase-Materialien,

Gele für die hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC), Hydroxylapatit-Medien (HAP) Affinitätschromatographie-Medien mit Liganden jeglicher Art, aber auch Gele mit magnetischen Eigenschaften (Magne-to-Beads, beschichtet oder unbeschichtet). Besonderes Merkmal derartiger Gele ist die Fähigkeit, die biologische Probe zu binden, wobei diese durch geeignete Elutionsmittel (Lösungen) von der bindenden Substanz auch wieder befreit werden können muss.

- b) Materialien, Verbindungen, Substanzen oder Lösungen, die die biologische Probe nicht zu binden vermögen. Dies sind beispielsweise (aber nicht ausschließlich) organische und/oder anorganische Säuren, Basen, Salzen, deren Derivaten oder Lösungsmitteln aller Art einschließlich wäßriger Lösungen. Besonderes Merkmal derartiger Lösungen und Substanzen (im weiteren Elutionslösungen genannt) ist die Fähigkeit zur Desorption (Elution) der biologischen Probe von dem Chromatographie-Gel, das heißt, zur Verschiebung der Gleichgewichte der Bindung der biologischen Probe an das Chromatographie-Gel in der Weise, dass die an das Chromatographie-Gel gebundenen Biomoleküle nach Zugabe der Elutionslösung keine bzw. nur noch geringe Affinitäten zum Chromatographie-Gel haben.

Die Erfindung ist für die automatisierte Suche nach geeigneten Chromatographiemedien und den zugehörigen Puffer- und Elutionsbedingungen zur Reinigung von Peptiden und Proteinen, aber auch anderen Biomolekülen aus Homogenaten (Rohextrakten) geeignet. Die Erfindung basiert auf der Absorption von Biomolekülen an Gelpartikel, an die sogenannte stationäre Phase. Eine biologische Probe, bestehend aus Biomolekülen wie Proteinen, Peptiden etc., gelöst im Startpuffer (mobile Phase), wird mit Gelpartikeln vermischt (sogenanntes Batch-Verfahren) und nach definierten Inkubationszeiten wird der flüssige Überstand, in dem sich die Biomoleküle befinden, die keine Affinität zum gewählten Gel unter den gewählten Bedingungen haben, von den Gelpartikeln entfernt. Die Gelpartikel werden anschließend mit Startpuffer gewaschen, um die nicht bindenden Moleküle möglichst weitgehend zu entfernen. Im nachfolgenden Schritt werden die an die Gelpartikel absorbierten Biomoleküle durch eine geeignete Elutionslösung (mobile Phase) von den Gelpartikeln wieder in Lösung gebracht, um nach Eintritt in die mobile Phase (Desorption bzw. Elution) und Abtrennung von den Gelpartikeln diversen Analysen- und Nach-

weissystemen (Photometer, Bioassays, etc.) zugeführt werden zu können. Auf diese Weise lassen sich unterschiedlichste Chromatographieparameter wie z.B. Gelmedien, Puffer, pH, Lösungsmittelzusätze oder Substanzen zur Stabilisierung von Biomolekülen ermitteln.

5 Die Erfindung kann automatisiert durchgeführt werden, so dass die Ergebnisse aus (beispielsweise) einer 96-Well-Chromatographie manuell oder mittels einem Computerprogramm ausgewertet, übersichtlich dargestellt und für die Interpretation vorbereitet werden können. Die gewonnenen Daten werden in der Weise interpretiert, dass als Resultate der Interpretation Vorschläge für die chromatographische Reinigung von (beispielsweise) Proteinen aus Proteinextrakten einer biologischen Probe hervorgehen. Die Reinigung des Zielproteins kann auch mehrere verschiedene, sich aneinander anschließende Chromatographien (Kombinationen von Chromatographien) einschließen.

10 Die Erfindung sieht ferner einen Kit vor, in dem das erfindungsgemäße Verfahren Anwendung findet. Dieser dient der wirtschaftlichen Verwertung und kann bestimmte Chromatographiemuster in Form ausgewählter Chromatographiemedien für unterschiedlichste Anwendungszwecke (in Abhängigkeit der zu untersuchenden biologischen Probe) beinhalten und dementsprechend ausgerüstet sein. Hierzu können die Multi-Well-Platten bereits vorgefertigt sein mit Chromatographiemedien zu Bindung der biologischen Probe (Gruppe B-Materialien) und einem Set von unterschiedlichsten Chromatographiemedien (Lösungen jeglicher Zusammensetzung) zur Elution (Gruppe NB-Materialien).

15 Das System (Kit) beinhaltet Protokolle zur Durchführung der Experimente im Multiwell-Format mit n Kavitäten ($n > 1$), auf Multiwell-Platten verteilte, kommerziell verfügbare Chromatographiemedien, sowie auf Multiwell-Platten verteilte Elutionsmittel, die an die jeweiligen Chromatographiemedien angepasst sind. Das System dient der systematischen Suche nach reproduzierbaren chromatographischen Reinigungsschritten für Biomoleküle. Das System ist auf die Kombination von Pipettier-Roboter ausgelegt, kann aber auch manuell genutzt werden. Bedingt durch die gewählten verschiedenen Chromatographie-Parameter (z.B. pH-Wert, Ionenkonzentration, etc.) werden unterschiedliche Populationen von Biomolekülen an die Gele in den verschiedenen Gele binden. Wird beispielsweise als Chromatographiegel ein

Anionenaustauschergel benutzt, werden an das Gel in B1 (Fig. 1, die Lösung in der Kavität B1 hat einen pH von 4 und eine NaCl-Konzentration von 50 mmol/l) Biomoleküle binden, die bei pH 4 noch ausreichend viele negative Ladungen besitzen, also einen niedrigen isoelektrischen Punkt haben. Die niedrige NaCl-Konzentration bewirkt, dass bereits Biomoleküle mit niedriger Affinität an das Gel binden. In der Kavität G11 (Fig. 1, die Lösung in der Kavität G11 hat einen pH von 7 und eine NaCl-Konzentration von 750 mmol/l) können Biomoleküle mit einem wesentlich höheren isoelektrischen Punkt erwartet werden. Gleichzeitig werden, bedingt durch die hohe NaCl-Konzentration nur Biomoleküle mit sehr hoher Affinität an die Gelpartikel binden, die überwiegende Mehrzahl der Biomoleküle wird in Lösung bleiben. Das System wird auch Protokolle enthalten, um die an den Gelpartikeln konzentrierten Biomoleküle weiter analysieren zu können, z.B. über die Proteinbestimmung oder die Elektrophorese.

Vorteile der Erfindung mithin bestehen in folgendem:

- Im Vergleich zu den kommerziell verfügbaren Methoden ermöglicht die Erfindung durch den Parallel-Ansatz im Multi-Well-Format das Auffinden geeigneter Chromatographiemedien und der zugehörigen Elutionsmittel in sehr viel kürzerer Zeit als bisher.
- Die Suche nach geeigneten Bedingungen zur chromatographischen Reinigung bzw. Fraktionierung von Biomolekülen kann mit Rohextrakten durchgeführt werden. Für die Versuche müssen die Biomoleküle durch Homogenisierungsschritte lediglich in Lösung gebracht werden und die Homogenate durch einfache Zentrifugation von Partikeln befreit werden. In diesem Punkt ist die Erfindung anderen Methoden wie der Festphasen-Extraktion oder der Säulen-Chromatographie deutlich überlegen, da in beiden Fällen ein Verstopfen der Säulen droht.
- Die bei Festphasen-Extraktionssystemen nachteiligen, in der Regel sehr kurzen Zeiten, in denen die Biomoleküle mit der stationären Phase des Chromatographiemediums in Kontakt treten können, können zur Folge haben, dass keine vollständige Adsorption der Biomoleküle an das Chroma-

tographiemedium stattfindet. Diese Gefahr herrscht bei dem hier vorgestellten System nicht, da längere Inkubationszeiten gewählt werden können.

- Das System bedarf nicht, wie die Festphasen-Extraktion einer Vakuumquelle zum Entfernen der Elutionsmittel. Die mit der Vakuumtechnik verbundenen Probleme wie unvollständiges Absaugen der Elutionsmittel haben deshalb keine Bedeutung.
- Das System kann zur Entwicklung von Reinigungsschritten von Biomolekülen eingesetzt werden.
- Das System kann (z.B. in Kombination mit der Massenspektrometrie) für vergleichende Untersuchungen der Biomolekül-Profile ("Profiling") zweier verschiedener Zustände ("Differential Display") herangezogen werden, um Moleküle identifizieren zu können, die für einen definierten Zustand (z.B. krank) charakteristisch sind.
- Das System kann als Probenvorbereitung für 2D-Elektrophorese-Strategien genutzt werden.

Es ergeben sich mithin Vorteile für biotechnologische Industrie und für die Pharma-Industrie durch schnelle Methoden-Entwicklung zur chromatographischen Aufreinigung technologisch / therapeutisch / diagnostisch relevanter Proteine. Für die Proteomforschung (Pharma-Industrie, Biotechnologie, Biomedizinische Forschung) bestehen Vorteile in der Vorfraktionierung von Proteinen für die Proteomanalyse; grundsätzlich aber wird eine schnelle Methoden-Entwicklung zur chromatographischen Aufreinigung interessierender Proteine geschaffen.

Weitere vorteilhafte Maßnahmen sind in den übrigen Unteransprüchen enthalten. Die Erfindung ist in den anliegenden Zeichnungen dargestellt und wird nachfolgend näher beschrieben; es zeigt

Figur 1

die schematische Darstellung einer 96 Well Platte, hier belegt mit 96 diversen Startpuffern für die multiparallele Anionenaustausch-Chromatographie;

Figur 2

Proteinkonzentrationen der Eluate (Einstufene-
lution mit 2 mol/l NaCl) der 96 Fraktionen der 96-
Well-Kationenaustausch-Chromatographie;

Figur 3

Proteinkonzentrationen und spezifische En-
zymaktivitäten von Renin-ähnlichen Enzymen der
Fraktionen der 96-Well-Chromatographie mit 2 ver-
schiedenen Gelen für Hydrophobe-Interaktions-
Chromatographie (HIC);

Figur 4

Proteinkonzentrationen der Fraktionen einer 96-
Well-Kationenaustausch-Chromatographie mit Stu-
fengradienten-Elution. Gradientenstufe 1: 0,5 mol/l
NaCl; Gradientenstufe 2: 2 mol/l NaCl. UCE: Uroten-
sin-generierende Aktivität.

Die Erfindung wird anhand von Fraktionierungsversuchen eines Schweine-Nieren-
Extrakts demonstriert. Wie in den unten genannten Beispielen gezeigt, werden hier-
zu Aliquots des Gewebeextrakts auf eine 96-Well-Platte verteilt, in deren Kavitäten
sich jeweils gleiche Mengen eines Anionenaustauschergels befinden. Die einzelnen
Kavitäten unterscheiden sich in Bezug auf den pH-Wert und in Bezug auf die Io-
nenstärke. Das Ergebnis der Trennung wird über eine Bestimmung der Proteinkon-
zentration der an das Gel gebundenen Proteine der einzelnen Kavitäten erhalten.

Die Figur 1 zeigt beispielhaft eine 96 Well-Platte (Multiwell-Platte), die durch Spalten
(X-Richtung) und Zeilen (Y-Richtung) als Matrix definiert ist, wobei unterschiedliche
Chromatographiemedien ortsabhängig auf den durch die Matrix definierten Matri-
zenpunkten der Platte angeordnet sind, deren einzelne Kavitäten mit jeweils glei-
chen Mengen Chromatographiegel belegt sind (z.B. mit einem Anionenaustau-
schergel), aber individuelle Kombinationen von pH-Werten und Kochsalz-
Konzentrationen besitzen. Kavität B1 zeigt im Beispiel der Fig. 1 einen pH von 4,5
und eine NaCl-Konzentration von 0,05 mol/l. Kavität G12 hätte einen pH von 7,0
und eine NaCl-Konz. von 1 mol/l.

Die Figur 2 zeigt die Ergebnisse der Bestimmung der Protein-Konzentrationen der Fraktionen der 96-Well-Kationenaustauschchromatographie entsprechend dem Ausführungsbeispiel 1. Für das Finden geeigneter Bedingungen für die Aufreinigung eines gesuchten Proteins können die Daten, die in Fig. 2 dargestellt sind, nach folgenden Regeln genutzt werden:

1. Die gewählte Chromatographie (hier Kationenaustauschchromatographie) kann dann als günstiger initialer Schritt zum Konzentrieren genutzt werden, wenn das gesuchte Protein in einer Fraktion eluiert, in der eine im Vergleich zu den anderen Fraktionen niedrige Proteinkonzentration zu finden ist (z.B. Fig. 2 in der Fraktion pH 4, 0 mmol/l NaCl; der „Tal“-Bereich der 3-dimensionalen Abbildung).
2. Sollte das gesuchte Protein in einer Fraktion zu finden sein, in der eine im Vergleich zu den anderen Fraktionen sehr hohe Proteinkonzentration vorkommt (z.B. Fig. 2, Fraktion pH 6,5; 100 mmol/l NaCl, der „Berg“- bzw. „Gipfel“-Bereich) sollten andere Chromatografiemedien wie Anionenaustauscher darauf geprüft werden, ob das gesuchte Protein sich im „Tal“-Bereich wiederfinden lässt.
3. Liegt der unter Punkt 2 beschriebene Fall vor (das gesuchte Protein eluiert im „Gipfel“-Bereich) und es ist keine andere Chromatographie zu finden, die die unter Punkt 1 beschriebenen Kriterien erfüllt, dann sollte der 2. Ansatz (96-Well-Chromatographie mit Stufengradienten-Elution) genutzt werden, um geeignete Bedingungen zur Reinigung des gesuchten Proteins zu finden.

Die Werte der Fraktionen mit gleichem pH-Wert wurden jeweils verbunden, so dass jeweils eines der 12 Profile den Verlauf der Proteinkonzentrationen von Salzkonzentrationen von 0 bis 500 mM darstellt. Der Kurvenverlauf kann ähnlich wie ein Chromatogramm einer Gradienten-Elutionschromatographie gelesen werden, mit dem Unterschied, dass hier keine Gradientenelution vorliegt, sondern die Qualität und die Quantität der jeweils bindenden Proteine von den Startbedingungen, nämlich der Salzkonzentration und dem pH-Wert, abhängt.

Neben dem Vorteil der 96-Well-Chromatographie, in sehr kurzer Zeit eine große Zahl verschiedener Chromatographie-Parameter auf ihre Brauchbarkeit prüfen zu können, wird in der Fig. 2 ein weiterer Vorteil sichtbar, der mit bisherigen Gradienten-Chromatographie-Techniken nur mit großem Aufwand aufspürbar wäre, nämlich die Phänomene, die bei den Puffern der pH Werte 6,5 und pH 7 auftreten. Hier sind bei Salzkonzentrationen von jeweils 300 mmol/l NaCl Maxima in der Proteinkonzentration zu sehen, die hier eigentlich nicht erwartet werden. Der Erwartung entspricht, dass die Konzentration der an den Kationenaustauscher gebundenen Proteine bei einer Startkonzentration von 0 mmol/l Salz am höchsten ist und die Konzentration der gebundenen Proteine mit steigender Salzkonzentration der Startlösung abnimmt. Das Auftreten der oben beschriebenen Maxima kann damit erklärt werden, dass die höheren Salzkonzentrationen hydrophobe Wechselwirkungen (unabhängig von den elektrostatischen Wechselwirkungen) zwischen Proteinen und dem Gel begünstigen, was zu einer verstärkten Absorption von Proteinen an das Gel führt. Es handelt sich hier also um Phänomene, die mit nicht-idealen Chromatographie-Mechanismen (Schlüter H, Zidek W. J. Chromatogr. 639. 17-23 (1993)) bezeichnet werden können, was bedeutet, dass (in diesem Fall) nicht nur elektrostatische Wechselwirkungen auf die Bindung der Proteine an die stationäre Phase sondern auch andere Wechselwirkungen (hier hydrophobe Wechselwirkungen) einen maßgeblichen Einfluss haben und damit vorteilhaft für die Trennung genutzt werden können. Phänomene dieser Art lassen sich durch empirische Strategien finden, das heißt, je mehr Parameter variiert werden können, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, die notwendigen Parameter zu finden und vorteilhaft nutzen zu können.

Die Figur 3 zeigt zum 2. Ausführungsbeispiel Proteinkonzentrationen und spezifische Enzymaktivitäten von Renin-ähnlichen Enzymen der Fraktionen der 96-Well-Chromatographie mit 2 verschiedenen HIC-Gelen (Phe: Phenyl-Sepharose-Gel, Amersham Bioscience; Pro: Propyl-Sepharose-Gel, Amersham Bioscience). Aliquots der Probe wurden jeweils in die Kavitäten (1A bis 4A und 1B bis 4B) mit den HIC-Gelen pipettiert, in denen sich Salzlösungen, wie in Tabelle 2 angegeben, befanden.

Die Figur 4 zeigt Proteinkonzentrationen der Fraktionen einer 96-Well-Kationenaustausch-Chromatographie mit Stufengradienten-Elution. Gradientenstufe

1: 0,5 mol/l NaCl; Gradientenstufe 2: 2 mol/l NaCl. UCE: Urotensin-generierende Aktivität. Es ist erkennbar, dass eine Urotensin-bildende Aktivität (UCE-Aktivität) lediglich in der Fraktion nachweisbar war, bei der der Proteinextrakt bei pH 8 auf das Gel aufgetragen wurde und die mit 2 mol/l NaCl eluiert wurde. Es ist deutlich zu erkennen, dass mit 0,5 mol/l (bei pH 4,5 bis 8) die höchsten Proteinmengen eluierbar sind. Die UCE-Aktivität eluiert in der Chromatographie mit dem pH 8-Puffer jedoch erst nach Elution mit einer 2 molaren Salzkonzentration. Dieses Ergebnis ist für die Aufreinigung des UC-Enzyms von großem Vorteil, da das UCE in einer Fraktion mit niedriger Proteinkonzentration eluiert und auf diese Weise eine große Menge der begleitenden Proteine (ca. 95 % der ursprünglich aufgetragenen Proteinmenge) abgetrennt werden können.

1. Ausführungsbeispiel: 96-Well-Kationenaustausch-Chromatographie mit verschiedenen Startbedingungen (Variation der pH-Werte (Ziffernreihe, „Zeilen“) und der Salzkonzentration (Buchstabenreihen, „Spalten“) und einstufiger Elution.

A. Probengewinnung: Herstellung von Proteinextrakten aus der Niere von Schweinen:

Für die Herstellung von Proteinextrakten werden Nieren von Schweinen verwendet. Direkt nach ihrer Entnahme im Schlachthof werden diese in physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl-Lösung) bis zur weiteren Verarbeitung gekühlt. Das Nierengewebe wird (bei Temperaturen von 4 bis 6°C) in ca. 1 cm³ große Stücke geschnitten, in vorgekühlte Lyophilisationsgefäße gefüllt, in Flüssigstickstoff eingefroren und über Nacht bei -80°C gelagert. In der Lyophilisationsanlage (Typ 2040 der Fa. Snijders Tilbug, Holland) werden die Gewebestücke ca. eine Woche 1 Woche vollständig getrocknet. Die wasserfreien Gewebestücke werden dann mit einer Getreidemühle (Varius, der Fa. Messerschmidt) auf feinsten Stufe pulverisiert. 2 g des Pulvers werden in 20 ml Puffer (10 mM Phosphat-Puffer, pH 7,3) gelöst. Hierfür wird ein Homogenisator (Ultra Turrax T 25 der Fa. Jahnke-Kunkel) verwendet.

B. Vorbereitung des Kationenaustauscher-Gels (Fractogel EMD-SO3; Merck, Darmstadt) und Durchführung der 96-Well-Kationenaustausch-Chromatographie mit einstufiger Elution:

Das Gel (bei einer Befüllung von 300 µl / Kavität: ca. 0,3 ml x 100 = 30 ml) wird mit dem 5-fachen Gelvolumen mit 2 molarer wässriger NaCl-Lösung und anschließend mit dem 10fachen Gelvolumen Wasser gewaschen. Die Leitfähigkeit nach dem letzten Waschvorgang sollte dem des Wassers entsprechen.

5 Anschließend wird das Gel (300 µl / Kavität) auf die 96 Kavitäten einer 96-Deep-Well-Platte (2,2 ml) verteilt und je 1000 µl Puffer (40 mmol/l) 1 bis 12 (Tabelle 1) in die Kavitäten der Reihen 1 bis 12 zugegeben, so dass sich jeweils in einer Reihe der 96-Well-Platte (beziffert mit 1. bis 12, siehe Figur 1) ein und derselbe Puffer mit identischem pH-Wert befindet. Anschließend werden in die Kavitäten jeweils 400 µl der Salzlösungen (NaCl, in mmol/l (Endkonzentration): A: 50; B: 100; C: 150; D: 200; E: 250; F: 300; G: 400; H: 500) pipettiert, so dass beispielsweise alle Kavitäten der Bezeichnung A die Salzkonzentration von 50 mmol/l beinhalten. Parallel werden eine oder mehrere Kopien der Puffer gemäß des oben genannten Pipettierschemas angelegt, mit dem später die individuellen Kavitäten gewaschen werden.

15 In jede der 96 Kavitäten werden jeweils 300 µl der proteinhaltigen Probe (Proteinextrakt, siehe oben unter A.) gegeben.

Tabelle 1: Puffer für den Kationenaustauscher

Microtiterplatte Reihe	Puffer (40 mM Endkonzentration)	pH
1	Phosphorsäure	2,5
2	Zitronensäure	3
3	Zitronensäure	3,5
4	Ameisensäure	4
5	Bernsteinsäure	4,5
6	Essigsäure	5
7	Zitronensäure	5,5
8	Malonsäure	6
9	MES (2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure)	6,5
10	Phosphorsäure	7
11	Phosphorsäure	7,5
12	HEPES	8

Nach der Zugabe der Probe werden Probe und Gel suspendiert und 10 min inkubiert. Danach wird die 96-Well Platte zentrifugiert (Speed-Vac Zentrifuge: 1 min). Der Überstand wird auf eine 96-Well Platte kopiert und für Analysen (Proteinkonz. Best., Aktivität, etc.) aufgehoben. Die 96 verschiedenen individuellen Proben-Gel-

5 Suspensionen in der 96-Well-Platte werden mit den entsprechenden, individuellen Pufferlösungen (jeweils 300 µl, die Puffer werden aus einer 96-Deepwell-Platte kopiert, in der sich entsprechend dem oben angegebenen Schema die individuellen Lösungen befinden) suspendiert, um die 96 Gele zu waschen, anschließend zentrifugiert und die überstehende Lösung abpipettiert und verworfen, um die nicht-
10 bindenden Proteine zu entfernen. Dieser Vorgang wird 2 mal wiederholt. Nach dem Waschen werden die bindenden Proteine eluiert, indem in die Kavitäten eine 2 molare NaCl-Lösung (pro Kavität 100 µl) zupipetiert wird. Nach der Zentrifugation (1 min) werden die Eluate auf ein oder mehrere 96-Well-Platten kopiert, um die individuellen Proben der nachfolgenden Analytik zugänglich zu machen.

Die Analytik der Fraktionen der 96-Well-Chromatographie-Fraktionen kann die Bestimmung der Protein-Konzentration, der Enzymaktivität, dem Nachweis einer Proteineigenschaft, z.B. mit einem Antikörper, sowie die Zusammensetzung der Fraktion (Elektrophorese, 2D- Elektrophorese) umfassen.

15 Die Vorteile dieser Versuchsausführung liegen darin, auf diese Weise im Idealfall (d.h. wenn das gesuchte Protein eine hohe Affinität zum Säulenmaterial hat) Chromatographie-Bedingungen zu finden, unter denen das gesuchte Protein bindet, jedoch ein Großteil der begleitenden Proteine nicht binden und auf diese Weise deren Abtrennung gelingt. Hat das gesuchte Protein lediglich eine schwache Affinität, lassen sich Bedingungen finden, bei denen das gesuchte Protein nicht bindet, jedoch
20 ein großer Teil der nicht interessierenden Proteine. Die Resultate können dann für eine Frontal-Chromatographie benutzt werden. Auf diese Weise lassen sich somit Chromatographie-Parameter (Chromatographiemedien, pH, Puffer, Salzkonzentrationen, Zusätze) zum Konzentrieren von Proteinen auffinden, insbesondere aus Rohextrakten, ferner kann das chromatographische Verhalten eines unbekannten, gesuchten Proteins ermittelt werden und letztlich können Bindungskapazitäten bestimmt werden.
25

30 2. Ausführungsbeispiel: 96-Well-Hydrophobe-Interaktions-(HIC)-Chromatographie mit verschiedenen Startbedingungen (Variation der pH-Werte (Ziffernreihe, „Zeilen“) und zweier verschiedener Gele (Buchstabenreihen A und B, „Spalten“) und einstufiger Elution.

A. Probengewinnung: Herstellung von Proteinextrakten aus der Niere von Schweinen:

Siehe hierzu oben unter 1. Ausführungsbeispiel, Ziffer A..

5 B. Vorbereitung der HIC-Gele (Phenyl-(Phe)-Sephacrose-Gel, Amersham Bioscience; Propyl-(Pro)-Sephacrose-Gel, Amersham Bioscience) und Durchführung der 96-Well-HIC-Chromatographie:

10 Die Gele (bei einer Befüllung von 500 µl / Kavität: ca. 0,5 ml x 8 = 4 ml) werden mit dem 10-fachen Gelvolumen Wasser gewaschen. Anschließend wird das Gel (500 µl / Kavität) in die Kavitäten 1A bis 4A (Phe-Gel) und 1B bis 4B (Pro-Gel) einer 96-Deep-Well-Platte (2,2 ml) verteilt. Zu den Gelen werden je 1000 µl Puffer 1 bis 4 (Tabelle 2) in die Kavitäten der Reihen 1A bis 4A und 1B bis 4B zugegeben, so dass sich jeweils in den Kavitäten der 96-Well-Platte beziffert mit 1 bis 4 die Puffer entsprechend der Tabelle 2 befinden (z.B. in Kavität 2A und 2B: Puffer 2: 1M NaCl, 0.1 M NaHCO₃, pH 8,3).

15 Parallel werden eine oder mehrere Kopien der Puffer gemäß Tabelle 2 angelegt, mit dem später die individuellen Kavitäten gewaschen werden. In jede der 8 Kavitäten werden jeweils 20 µl der proteinhaltigen Probe (Proteinkonzentration 0.14 µg/µl; Proteinextraktgewinnung, siehe oben unter A.) gegeben.

20 Tabelle 2: Puffer für die HIC-Chromatographie

Microtiterplatte Reihe	Puffer	PH
1	2 mol/l NaCl, 0.1 M NaHCO ₃	8,3
2	1 mol/l NaCl, 0.1 M NaHCO ₃	8,3
3	1 mol/l NH ₄ SO ₄ (AS), 0.1 mol/l NaHCO ₃	8,3
4	1 mol/l NH ₄ SO ₄ (AS), 0.1 mol/l NaHCO ₃	8,3

25 Nach der Zugabe werden Probe und Gel suspendiert und 30 min über Kopf geschüttelt. Danach wird die 96-Well Platte zentrifugiert (Speed-Vac Zentrifuge: 1 min). Der Überstand wird auf eine 96-Well Platte kopiert und für Analysen (Proteinkonz. Best., Aktivität, etc.) aufgehoben. Die 8 verschiedenen individuellen Proben-Gel-Suspensionen in der 96-Well-Platte werden mit den entsprechenden, individuel-

len Pufferlösungen (jeweils 500 µl, die Puffer werden aus einer 96-Deepwell-Platte kopiert, in der sich entsprechend der Tabelle 2 die individuellen Puffer befinden) suspendiert, um die 8 Gele zu waschen, anschließend zentrifugiert und die überstehende Lösung abpipettiert und verworfen, um die nicht-bindenden Proteine zu entfernen. Dieser Vorgang wird 2 mal wiederholt. Nach dem Waschen werden die bindenden Proteine eluiert, indem in die Kavitäten je 250 µL einer 0,1 molaren NaHCO₃-Lösung (pH 8,3) zupipetiert werden. Nach der Zentrifugation (1 min) werden die Eluate auf ein oder mehrere weitere 96-Well-Platten kopiert, um die individuellen Proben der nachfolgenden Analytik zugänglich zu machen. In diesem Beispiel wurden die Proteinkonzentration und die Enzymaktivitäten Renin-ähnlicher Enzyme der Eluate bestimmt. Die Bestimmung der Renin-ähnlichen Enzymaktivität erfolgte wie in Jankowski et al. 2001 beschrieben (Jankowski, J. et al. (2001) Anal Biochem. 290, 324-9). Die Ergebnisse sind in Figur 3 dargestellt.

Der Vorteil dieser Anwendung liegt u.a. darin, dass für die Planung einer Gradientenelution (kontinuierlicher bzw. Stufen-Gradient) mit diesem System die Parameter erkundet werden können, unter denen ein optimales Ergebnis bei einer Säulenchromatographie zu erwarten ist. Für dieses Ausführungsbeispiel kann es ferner vorteilhaft sein, Ergebnisse aus dem Ausführungsbeispiel 1 in den experimentellen Ansatz einfließen zu lassen, z.B. das dort ermittelte optimale Gel oder eine geeignete Startbedingung zu verwenden.

Bei diesem Ausführungsbeispiel wird im Verhältnis zum 1 Ausführungsbeispiel weniger Gel benötigt. Ferner sind Informationen über Elutionsparameter für die Chromatographie vom gesuchten Protein erhältlich.

3. Ausführungsbeispiel: Im folgenden werden einige Beispiele für unterschiedliche Parameter und deren Variationen gegeben, die bei der Auswahl geeigneter Chromatographiebedingungen von Bedeutung sind (für verschiedene 96-Well-Chromatographien)

1. Variation der Salz-Anionen zum Eluieren der Biomoleküle vom Anionenaustauscher: ClO₄⁻, SCN⁻, p-tosyl⁻, I⁻, Br⁻, NO₃⁻, Cl⁻, H₂PO₄⁻, CH₃COO⁻, F⁻

2. Variation der Zusätze zur Stabilisierung der Biomoleküle: beispielsweise (aber nicht ausschließlich) Glycerol, Sucrose, Natriummolybdat, Ethyleneglycol, Harnstoff, Guanidiniumchlorid, Betaine, Taurin, DTE, DTT, EDTA, EGTA, Monothioglycerol, Detergentien, Polyethylenglykol (PEG), Chloroform, Methanol, H₂O, Proteaseinhibitoren (EDTA, EGTA, PMSF, DFP, Benzamidine, Aprotinin, Pefabloc SC, TLCK, TPCK, Phosphoramidon, Antipain, Leupeptin, Pepstatin A, Hirudin) oder andere dem Fachmann geläufige Substanzen.

3. Ionenaustausch-Chromatographie-Medien (Beispiele):

Tabelle 3

Gel	Matrix
DEAE-Sephadex A-25	Dextrane
DEAE-Sephadex A-50	
QAE-Sephadex A-25	
QAE-Sephadex A-50	
DEAE-Sephacel CL-6B	Agarose, cross-linked
DEAE-Trisacryl M	Copolymer ³
DEAE-Sephacel	Cellulose, beaded
DE 51	Cellulose
DE 52	
DE 53	
DE 92	
QA 52	
QA 92	
Express-Ion D	
Express-Ion Q	
DEAE A-200 Cellufine	Cellulose
DEAE A-500 Cellufine	
DEAE A-800 Cellufine	
DEAE-Spherodex M	Dextran-coated Silica
DEAE-Spherodex LS	
DEAE Thruput	Agarose
Q Thruput	
DEAE-Sephacel FF	Agarose

4. Hydrophobe Interaktions-Chromatographie (HIC):

- Variation der Hydrophobizität des Gels (z.B. Butyl-Sepharose < Octyl-Sepharose < Phenyl-Sepharose)

- Variation der Gelmatrix
- Variation von pH Werten
- Variation von Salzen gemäß der Hofmeister-Reihe
- Zusätze von organischen Lösungsmitteln zum Startpuffer bzw. zur Elutionslösung

5.

5. Metallaffinitätschromatographie (IMAC):

- Variation der Metallionen: Ca^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , La^{3+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+}
- Variation der komplexierenden Gruppe (Chelat) des Gels (z.B.): Imino-diessigsäure (IDA), Tris(carboxymethyl)ethylendiamin (TED), Nitrilotriessigsäure (NTA).
- Variation des Startpuffers (z.B.): 0,5 bis 2 M NaCl.
- Variation der Gelmatrix.
- Variation der Elution: a) pH Gradient (variation der pH-Werte in Richtung sinkender pH-Werte). b) Elution mit einem kompetitiven Liganden (z.B. Ammonium chloride, Sulfat, Imidazol, oder Histamin). c) Elution mit Chelaten (EDTA, EGTA).

10

15

6. Hydroxylapatit : Variation des Startpuffers (Phosphatpuffer)

7. Reversed-Phase (RP):

20

- Variation des Startpuffers:
 - a) Variation der Konzentration organischer Lösungsmittel (Acetonitril, Methanol, Ethanol, Isopropanol),

b) Variation von Ionenpaarreagenzien (z.B. Trifluoressigsäure (TFA), Triethylammoniumacetat (TEAA), etc.)

- Variation der Elutionsparameter

a) Art der organischen Lösungsmittel (Acetonitril, Methanol, Ethanol, Isopropanol)

b) Konzentrationen der organischen Lösungsmittel

c) Zusammensetzung der organischen Lösungsmittel

- Variation der Geleigenschaften

a) Hydrophobizität des Gels (z.B. C4, C8, C18)

b) Matrix des Gels (Silica oder Polymer)

c) poröse Gele, nicht poröse Gele

8. Affinitätschromatographie:

- Variation der Gele (Gele mit Farbstoffliganden, Gele mit immobilisierten Biomolekülen (Coenzymen etc.)

- Variation der Startpufferbedingungen (pH, Ionenstärke)

- Variation der Elutionsbedingungen (Elution mit kompetitiven Liganden, Elution durch Variation der Ionenstärke oder des pHs)

4. Ausführungsbeispiel: 96-Well-Kationenaustausch-Chromatographie mit Stufengradienten-Elution

A. Probengewinnung: Herstellung von Proteinextrakten aus der Niere von Schweinen:

Siehe hierzu oben unter 1. Ausführungsbeispiel, Ziffer A.. Die Homogenisation des gefriergetrockneten Nierenextrakts wurde hier im jeweiligen Startpuffer durchgeführt: Als Startpuffer (je 20 mmol/l) wurden verwendet: (1) Citrat-Puffer, pH 3; (2) Citrat-Puffer pH 3,5; (3) Formiat-Puffer pH 4; (4) Succinat-Puffer pH 4,5; (5) Essigsäure pH 5; (6) Malonat-Puffer pH 5,5; (7) Malonat-Puffer pH 6; (8) Phosphat-Puffer pH 7; (9) HEPES-Puffer pH 7,5; (10) HEPES-Puffer pH 8. Für jeden Ansatz wurden ca. 200 mg Nierengewebe-Pulver in 3 ml Puffer gelöst.

B. Vorbereitung des Kationenaustauscher-Gels (Fractogel EMD-SO₃; Merck, Darmstadt) und Durchführung der 96-Well-Kationenaustausch-Chromatographie mit Stufengradienten-Elution:

Das Gel (bei einer Befüllung von 500 µl / Kavität : ca. 0,5 ml x 100 = 50 ml) wird mit dem 5-fachen Gelvolumen mit 2 molarer wässriger NaCl-Lösung und anschließend mit dem 10-fachen Gelvolumen Wasser gewaschen. Die Leitfähigkeit nach dem letzten Waschvorgang sollte dem des Wassers entsprechen. Anschließend wird das Gel (500 µl / Kavität) auf die 10 Kavitäten einer 96-Deep-Well-Platte (2,2 ml) verteilt und je 1000 µl Puffer (20 mmol/l) der unter A. angegebenen Puffer ((1) Citrat-Puffer, pH 3; (2) Citrat-Puffer pH 3,5; (3) Formiat-Puffer pH 4; (4) Succinat-Puffer pH 4,5; (5) Essigsäure pH 5; (6) Malonat-Puffer pH 5,5; (7) Malonat-Puffer pH 6; (8) Phosphat-Puffer pH 7; (9) HEPES-Puffer pH 7,5; (10) HEPES-Puffer pH 8.) in die Kavitäten der Reihen 1 bis 10 zugegeben. Parallel werden die Puffer gemäß des oben genannten Pipettierschemas in Deepwell-Platten gefüllt, mit dem später die Gele gewaschen werden.

In jede der 96 Kavitäten werden jeweils 10 mg der proteinhaltigen Proben, gelöst im jeweiligen Startpuffer (1. bis 10; Proteinextrakt, siehe oben unter A.) gegeben. Nach der Zugabe der Probe werden Probe und Gel suspendiert und 10 min inkubiert. Danach wird die 96-Well Platte zentrifugiert (Speed-Vac Zentrifuge: 1 min). Der Überstand wird auf eine 96-Well Platte kopiert und für Analysen. (Proteinkonz. Best., Aktivität, etc.) aufgehoben. Die 10 verschiedenen individuellen Proben-Gel-Suspensionen in der 96-Well-Platte werden mit den entsprechenden, individuellen Pufferlösungen (jeweils 500 µl, die Puffer werden aus einer 96-Deepwell-Platte kopiert, in der sich entsprechend dem oben angegebenen Schema die individuellen Lösungen befinden) suspendiert, um die Gele in den 10 Kavitäten zu waschen, an-

schließlich zentrifugiert und die überstehende Lösung abpipettiert und verworfen, um die nicht-bindenden Proteine zu entfernen. Dieser Vorgang wird 5 mal wiederholt.

Nach dem Waschen werden die bindenden Proteine eluiert, indem in die Kavitäten 600 µl einer jeweils 0,5 molaren NaCl-Lösung zupipetiert wird. Nach der Zentrifugation (1 min) werden die Eluate auf eine 96-Well-Platten kopiert, um die individuellen Proben der nachfolgenden Analytik zugänglich zu machen.

Nach der Elution mit der 1. Gradientenstufe werden die noch bindenden Proteine eluiert, indem in die Kavitäten 600 µl einer jeweils 2 molaren NaCl-Lösung zupipetiert wird. Nach der Zentrifugation (1 min) werden die Eluate auf eine 96-Well-Platten kopiert, um die individuellen Proben der nachfolgenden Analytik zugänglich zu machen.

Für den Enzymassay werden aus den Eluaten 470 µl abgenommen und mit 100 µl eines 100 mM NaHCO₃-Kopplungspuffers gemäß der Vorschrift zur Immobilisierung von Proteinen an BrCN-aktivierte Sepharose (Amersham-Bioscience) gemischt, so dass ein pH-Wert von 8,3 erreicht wird. Dieses Gemisch zu 200 µl BrCN-aktivierten Sepharose Beads geben, und diese bei 4°C über Nacht inkubiert. Anschließend folgten Deaktivierungsschritte mit Glycin sowie Wasch-Schritte, gemäß der Vorschrift zur Immobilisierung von Proteinen an BrCN-aktivierte Sepharose (Amersham-Bioscience). Der Nachweis der Enzymaktivität eines Urotensin generierenden Enzyms (UCE) erfolgte nach Jankowski et al. 2001. Für die Bestimmung der Protein-Konzentration (nach Bradford; Kit von Pierce) der Eluate werden jeweils 10 µl abgenommen.

5. Ausführungsbeispiel: Entsalzung bzw. Umpufferung von Fraktionen der 96-Well-Chromatographie

Verschiedene Analyse-Techniken erfordern Protein-Fraktionen, die in definierten Puffern vorliegen. Um eine schnelle Entsalzung bzw. Umpufferung von maximal 96 Proben zu ermöglichen wurde ein Protokoll für diese Zwecke entwickelt. Ein 96-Deepwell-Platte mit einem Filter (20 µm, Macherey & Nagel) wird mit einem Größenausschlußgel (je 1000 µl/Kavität, Biogel P6, BioRad) gefüllt. Das Größ-

nausschlußgel sollte mit einem Puffer equilibriert sein, der elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Proteinen und dem Gel unterbindet. In einer Versuchsreihe wurde festgestellt, dass eine Umsalzung einer Proteinlösung von 2 mol/l NaCl auf 0,2 mol/l NaCl gelingt, wenn auf die mit 1000 µl Gel gefüllten Kavitäten 350 µl Probe aufgetragen werden. Die Entsalzung geschieht durch Zentrifugation der Probe durch das Größenausschlußgel. Bei diesem Versuchsansatz wurde eine Proteinausbeute von 79 % erzielt. Die Salzkonzentration betrug im Eluat 0,29 mol/l NaCl. Die Salzkonzentration im Eluat kann auf 0,2 mol/l reduziert werden, wenn das Probenvolumen der umzupuffernden Probe auf 300 µl reduziert wird. Die Proteinausbeute sinkt in diesem Fall jedoch auf 67 %.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Auffinden geeigneter Chromatographieparameter zur Trennung biologischer Moleküle, bestehend aus folgenden Verfahrensschritten

5 a) auf einer Multiwell-Platte, die durch Spalten (X-Richtung) und Zeilen (Y-Richtung) als Matrix definiert ist, werden unterschiedliche Chromatographiemedien ortsabhängig auf den durch die Matrix definierten Matrizenpunkten der Platte in den jeweiligen dortigen Kavitäten angeordnet, wobei die Chromatographiemedien einerseits aus die-biologische-Probe-bindenden Materialien (B) und andererseits aus die-biologische-Probe-nicht-bindenden Materialien (NB) besteht;

10 b) in den jeweiligen Kavitäten werden die unterschiedlichen Chromatographiemedien mit einer biologischen Probe in Kontakt gebracht,

15 c) wobei die Chromatographiemedien derart in den einzelnen Kavitäten der Multiwell-Platte angeordnet sind, dass in jeder einzelnen Kavität zum einen ein Chromatographiemedium der Gruppe B und der Gruppe NB vorhanden ist, zum anderen aber sich diese Chromatographiemedium der Gruppe B und der Gruppe NB wenigstens in einem einzigen Parameter unterscheiden,

20 d) die in den jeweiligen Kavitäten befindliche biologische Probe wird in an-bindende-Materialien-gebundene und nicht-gebundene Biomoleküle separiert,

e) die gebundenen und nicht-gebundenen Moleküle der biologischen Probe werden für jede einzelne Kavität in Abhängigkeit des in der jeweiligen Kavität befindlichen Chromatographiemediums analysiert.

25 2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei es sich bei der biologischen Probe um gereinigte oder ungereinigte Proteine, Peptide, Nukleinsäuren aller Art, Koh-

lenhydrate, Lipide und andere Biomolekülstoffklassen oder niedermolekulare Stoffwechselprodukte oder Gemische derselben handelt.

- 5 3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Chromatographiemedien der die biologische Probe bindenden Materialien (Gruppe B) ausgewählt sind aus Feststoffpartikel, die die Eigenschaft besitzen, Biomoleküle zu absorbieren, wie z.B. Affinitäts-Chromatographie-Medien, Anionenaustauscher, Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie-Medien, Hydroxylapatit-Chromatographie-Medien, Kationenaustauscher, Metallaffinitäts-Chromatographie-Medien, Reversed-Phase Materialien.
- 10 4. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Chromatographiemedien der die biologische Probe nicht-bindenden Verbindungen (Gruppe NB) ausgewählt sind aus organischen und/oder anorganischen Säuren, Basen, Salzen, deren Derivaten oder Lösungsmitteln aller Art sowie deren wäßrigen Lösungen.
- 15 5. Verfahren nach Anspruch 1, wobei Mittel zur Stabilisierung der biologischen Probe ausgewählt werden aus Glycerol, Sucrose, Natriummolybdat, Ethylenglycole, Harnstoff, Guanidiniumchlorid, Betain, Taurin, DTE, DTT, EDTA, EGTA, Monothioglycerol, Detergentien, Polyethylenglykol (PEG), Chloroform, Methanol, H₂O, Proteaseinhibitoren
- 20 6. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Zeitdauer des Inkontaktbringens der biologischen Probe mit den Chromatographiemedien frei wählbar ist.
7. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 7, wobei das Verfahren automatisiert ist.
- 25 8. Kit zum Auffinden geeigneter Chromatographiebedingungen bei der Trennung biologischer Moleküle nach dem Verfahren gemäß Anspruch 1 bis 7, bestehend aus zumindest
 - a) einer Multiwell-Platte, die durch Spalten (X-Richtung) und Zeilen (Y-Richtung) als Matrix definiert ist, wobei unterschiedliche Chroma-

tographiemedien ortsabhängig auf den durch die Matrix definierten Matrizenpunkten der Platte angeordnet sind,

- b) unterschiedlichen Chromatographiemedien zur Bestückung der Matrizenpunkte.

5

- 9. Kit nach Anspruch 8, wobei dieser eine Software zur Auswertung, Identifizierung und Interpretation der durch das Verfahren gem. Anspruch 1 bis 6 enthält.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein multiparalleles Chromatographie-System zur Methodenentwicklung zur Reinigung von Proteinen und anderen Biomolekülen. Das System nutzt Kavitäten von Multiwell-Platten (z.B. 96-Well-Platten), die mit Chromatographiegele befüllt sind und besteht aus diversen Startpuffern, in dem die zu chromatographierenden Proben gelöst werden und mit denen die Gele equilibriert sind und Lösungen zum Desorbieren (Eluieren) der an die Gele gebundenen Biomoleküle. Das System umfasst Hilfen zur Interpretation der Ergebnisse, die aus den sich an die Chromatographie anschließenden Analysen (z.B. Proteinkonzentrationsbestimmungen, Bioassays, etc.) hervorgehen. Diese Hilfen können auch aus Programmen bestehen, in die die Ergebnisse eingegeben werden und die nach Prozessierung der Ergebnisse Interpretationen und Vorschläge zur Gestaltung der Schritte zur Reinigung eines Biomoleküls liefern.

Fig. 3

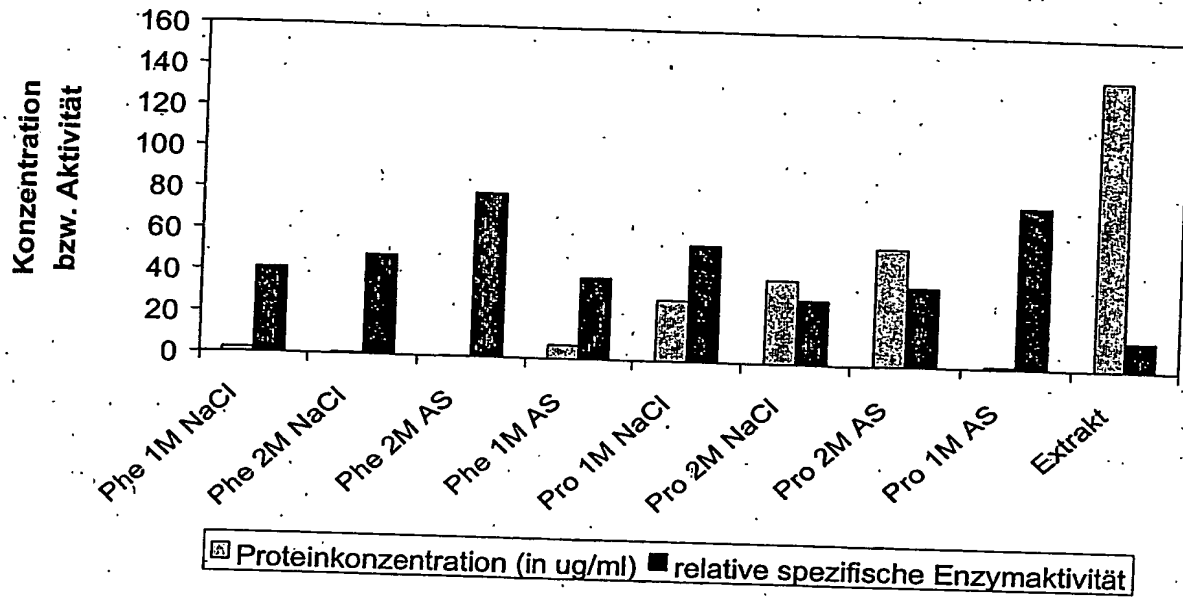
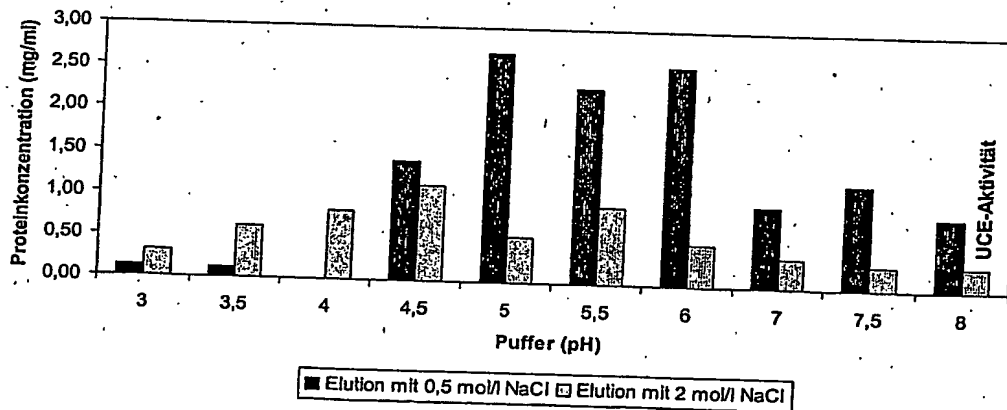


Fig. 4



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.